

## PROMJENE U EKSPRESIJI BILJNIH PROTEINA IZAZVANE NANOČESTICAMA SREBRA

Balen Biljana <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (bbalen@biol.pmf.hr)

### SAŽETAK

Nanotehnologija je zadnja u nizu tehnologija koje najavljuju novu eru u napretku društva. Male dimenzije nanočestica (engl. *nanoparticles*, NPs), s barem jednom dimenzijom između 1 i 100 nm, rezultiraju jedinstvenim kemijskim i fizikalnim značajkama, zbog čega se nanočestice proizvode u velikim količinama za upotrebu u proizvodima za široku potrošnju. Među različitim vrstama dostupnih nanomaterijala dominiraju nanočestice srebra (AgNP), zbog dobro poznatog protubakterijskog i protugljivnog učinka srebra. Zbog široke upotrebe AgNP, raste zabrinutost glede sigurnosti njihove upotrebe i mogućih štetnih učinaka na okoliš. Iako je do sada objavljeno nekoliko toksikoloških studija na nanočesticama srebra, još uvijek je teško donijeti konačne zaključke o njihovoj toksičnosti. Naime, čim se oslobode u okoliš, započinje njihova transformacija, što mijenja njihova svojstva i time direktno utječe na transport, sudbinu i moguću toksičnost nanosrebra. Kao primarni proizvođači, biljke predstavljaju vitalan dio zdravog ekološkog sustava, ali također imaju i važnu ulogu u transportu i bioakumulaciji toksičnih tvari u hranidbene lance. Toksikološke studije o učincima AgNPs provedene na biljkama su malobrojne i nedorečene. Nadalje, nedostaju i podaci o učincima AgNPs na važne stanične procese. Stoga, u našim istraživanjima želimo otkriti i objasniti toksične učinke nanosrebra na biljke, što će doprinijeti procjeni okolišnog rizika izlaganja nanočesticama srebra, ali i novim saznanjima o mehanizmima toksičnosti. Istraživanja provodimo na luku i duhanu, ekonomski važnim biljnim vrstama koje se često koriste i kao modelni organizmi u istraživanjima abiotičkog stresa. Cilj nam je utvrditi dolazi li tijekom izlaganja različitim razvojnih stadija ovih biljaka nanosrebru do kvalitativnih i kvantitativnih promjena u ekspresiji proteina i definirati osjetljive i selektivne biomarkere toksičnosti nanočestica srebra koji bi se mogli koristiti u biomonitoringu okoliša. Dobiveni rezultati moći će se primijeniti i za procjenu sigurnosti korištenja nanočestica srebra u poljoprivrednim proizvodima, kao što su umjetna gnojiva i pesticidi, koji se sve više koriste u uzgoju ostalih poljoprivrednih vrsta.

**Ključne riječi:** abiotički stres, nanosrebro, proteini, elektroforeza, spektrometrija masa

### UVOD

Zanimanje za nanomaterijale s kontroliranom strukturom i funkcijom u neprestanom je porastu. Male dimenzije nanočestica (engl. *nanoparticles*, NPs), s barem jednom dimenzijom između 1 i 100 nm, rezultiraju jedinstvenim kemijskim i fizičkim značajkama koje doprinose poboljšanju magnetskih, električnih, optičkih, mehaničkih i strukturnih svojstava u usporedbi s većim česticama istog materijala. Zbog velike površine i katalitičke aktivnosti te intrinzičnih fizikalno-kemijskih, opto-elektroničkih i bioloških svojstava, nanomaterijali nalaze svoju primjenu u elektroničkoj industriji, medicini, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, proizvodnji energije i remedijaciji okoliša (Tolaymat i sur., 2010). Međutim, iste značajke koje nanočesticama daju poboljšana svojstva, koja se mogu iskoristiti u novim proizvodima, istovremeno izazivaju i zabrinutost glede sigurnosti njihove upotrebe jer NPs predstavljaju potencijalni rizik za okoliš te, što je još važnije, za ljudsko zdravlje.

## NANOMATERIJALI I NJIHOV UTJECAJ NA OKOLIŠ

Nanotehnologija se bavi stvaranjem funkcionalnih materijala, uređaja i sustava čija je veličina izražena na nanometarskoj razini. Prema broju dimenzija koje su izražene na nanoskali razlikujemo 3 tipa nanostrukura: nanostrukturirane površine, koje imaju samo debljinu površine objekta izraženu na nanoskali; nanocjevčice, čiji se promjer nalazi između 1 i 100 nm te spadaju u dvodimenzijske objekte; i nanočestice, koje svaku prostornu dimenziju imaju na nanoskali i pripadaju trodimenzijskim nanoobjektima (Ivanković, 2011).

Napredak i dosadašnja postignuća u području nanoznanosti i nanotehnologije rezultirali su u primjeni nanomaterijala, ne samo u znanstvenoj djelatnosti, nego i mnogim proizvodima koji se nalaze na policama trgovina i ljekarna. Zato ne čudi činjenica da su istraživanja u ovom području tehnologije trenutno u punom zamahu, a u prilog tome idu i najnoviji ekonomski izvještaji o globalnom tržištu nanotehnologije koje je 2014. godine bilo procijenjeno na 26 milijardi američkih dolara, s očekivanim rastom na 64,2 milijarde dolara do 2019. godine (Nanotechnology: A realistic market assessment, NAN031F).

Prema najnovijim podacima na europskom tržištu se trenutno nalazi preko dvije tisuće proizvoda koji sadrže nanomaterijale, i to najčešće nanočestice srebra, titanijeva dioksida, silicijeva dioksida, cinkova oksida ili ugljika, a moguće ih je naći u kozmetičkim proizvodima, bojama, dodacima prehrani, zaštitnim premazima, filterima za vodu, odjeći i sportskoj opremi (Vance i sur., 2015). S obzirom na navedenu raširenost uporabe nanomaterijala, postavlja se pitanje o mogućem negativnom utjecaju na biljni i životinjski svijet. Osim proizvoda koji sadrže nanomaterijale, potencijalnu opasnost za živi svijet su i proizvodni pogoni nanomaterijala, odlagališta otpada i postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Navedeni objekti nanočestice ispuštaju u zrak, vodu i tlo te tako na izravan način ljude izlažu njihovom utjecaju. Ta se izloženost dodatno povećava konzumacijom hrane i drugih proizvoda biljnog i životinjskog podrijetla koje su na identičan način u sebi akumulirale nanočestice. Vance i sur. (2015) navode kako se najveći postotak izloženosti ljudi nanomaterijalima ostvaruje putem kože (58% poznatih proizvoda), zatim kroz dišne puteve (25% proizvoda), te na kraju kroz probavni sustav (16% proizvoda).

Nanočestice predstavljaju opasnost za organizme zbog građe koja uvjetuje njihova jedinstvena električna, kemijska, optička i fotoelektrokemijska svojstva (Lanje i sur., 2010). Mala veličina čestica u kombinaciji s velikom površinom te sposobnost poticanja proizvodnje reaktivnih oblika kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) igraju važnu ulogu u toksičnosti nanočestica. Takav je utjecaj vidljiv na razini cijelog organizma u obliku upala i fibroza, te na staničnoj razini gdje je vidljiva citotoksičnost i pojava oksidacijskog stresa (Nowack i sur., 2007).

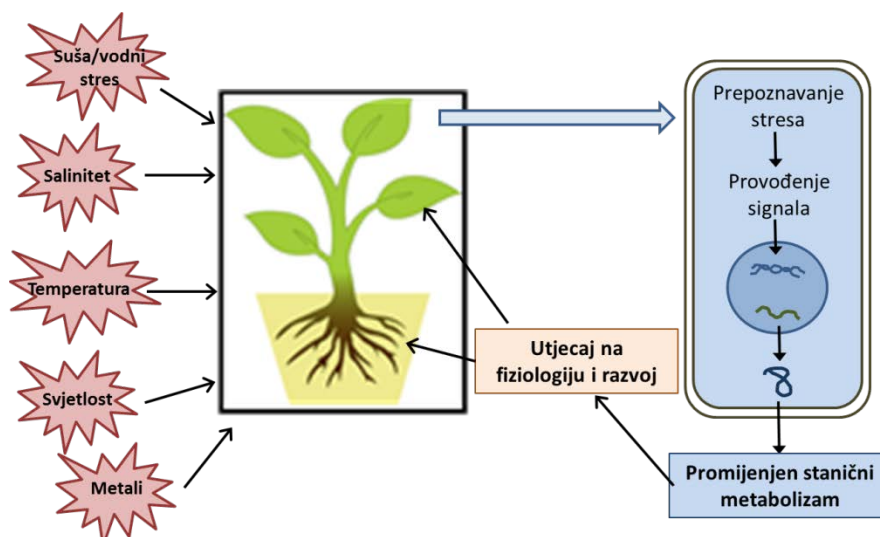
### Nanosrebro i abiotički stres

Između različitih dostupnih vrsta nanomaterijala, nanočestice srebra (AgNPs) posebno su zanimljive zbog dobro poznatog protubakterijskog i protugljivičnog učinka srebra, a može ih se pronaći u medicinskim instrumentima, tkaninama, proizvodima za pakiranje hrane i domaćinstvo. Prema Woodrow Wilson Inventory 38 (<http://www.nanotechproject.org>, November 2013) čestice nanosrebra dominantan su nanomaterijal prisutan u proizvodima

široke potrošnje. Istraživanja djelovanja nanosrebra na različite organizme pokazala su njegovu moguću toksičnost, koja je pripisana je brojim mogućim mehanizmima koji uključuju narušavanje cjelovitosti stanične membrane (Suresh i sur., 2010), vezanje i oštećivanje proteina i DNA (Arora i sur., 2009), stvaranje ROS (Hsin i sur., 2008) te apoptotičku staničnu smrt (Gopinath i sur., 2010). Međutim, postojanje kontradiktornih rezultata pokazuje da još uvijek nije dovoljno jasno do kojeg stupnja toksičnost nanočestica srebra potječe od samih nanočestica, a koliko se toksičnost može povezati s oslobođenim ionima srebra ( $Ag^+$ ) (Kawata i sur., 2009). Naime, čim se AgNPs oslobode u okoliš započinje njihova transformacija, što mijenja njihova svojstva i time direktno utječe na transport, sudbinu i moguću toksičnost nanosrebra. Čestice nanosrebra su sklone agregaciji u veće čestice, i, što je još važnije, oksidaciji elementarnog srebra u ionski oblik, što rezultira otpuštanjem iona  $Ag^+$ . Nadalje, različiti čimbenici, kao što su pH vrijednost, kisik te različite vrste iona i liganada utječu na topivost nanočestica srebra i međudjelovanje s  $Ag^+$ . Kako bi se povećala stabilnost nanočestica, u sintezi AgNPs koriste se različiti površinski omotači koji utječu na fizikalno-kemijska svojstva nanočestica (veličina i oblik, naboj površine te potencijal za vezanje i agregaciju), određujući time citotoksičnost AgNP i njihovu interakciju s biološkim molekulama (Suresh i sur., 2010).

Abiotički stres se definira kao negativan učinak neživih čimbenika na žive organizme u određenom okolišu, a proizlazi iz njihovog suviška ili nedostatka u fizičkom ili kemijskom okolišu. Kao posljedica abiotičkog stresa, vrlo često se javlja sekundarni, oksidacijski stres, koji ima snažan utjecaj na rast i razvitak biljnog organizma i može smanjiti produktivnost biljaka za 65 do 87%, ovisno o biljnoj vrsti. Okolišni uvjeti koji mogu izazvati abiotički stres su brojni kao na primjer suša (vodni stres), povišeni salinitet (osmotski stres), povišena ili snižena temperatura, svjetlost prejakog ili preslabog intenziteta, neadekvatna količina minerala (metala) u tlu te, između ostalog, i nanomaterijali. Čimbenici koji izazivaju abiotički stres, okidač su za široki raspon odgovora u biljaka. Već ranije spomenuti oksidacijski stres, koji se najčešće javlja kao posljedica abiotičkog stresa izazvanog bilo kojim čimbenikom, izaziva promjene u ekspresiji gena biljne stanice (i jezgrinog i plastidnog genoma), što izravno utječe na stanični metabolizma i u konačnici izaziva promjene u rastu i prinosima. Odgovor na stres je iniciran kada biljka prepoznaje stres na staničnom nivou, a prepoznavanje stresa aktivira put prijenosa signala koji provodi informaciju unutar pojedinačne stanice i kroz cijelu biljku (Slika 1). Promjene u ekspresiji gena mogu modificirati rast i razvoj i utjecati na reproduktivnu sposobnost biljke.

Istraživanja utjecaja AgNPs na ekološke sustave u fokusu su istraživanja. Ekološki sustav počiva na velikom broju organizama, a biljke su njegov vitalni dio jer su primarni proizvođači, služe kao izvor hrane za različite organizme, osiguravaju stanište za brojne vrste, stabiliziraju tlo itd. Nadalje, budući da biljke igraju važnu ulogu u akumulaciji i biodistribuciji mnogih tvari koje se otpuštaju u okoliš, postoji velika vjerojatnost da će na njih utjecati nanočestice srebra oslobođene u okoliš, čime biljke postaju potencijalni put za njihov transport i bioakumulaciju u hranidbene lance. Zbog toga, bilo koji negativan učinak nanočestica na rast biljke može uzrokovati značajne promjene u ekološkom sustavu te tako potencijalno izazvati nepovratnu štetu.



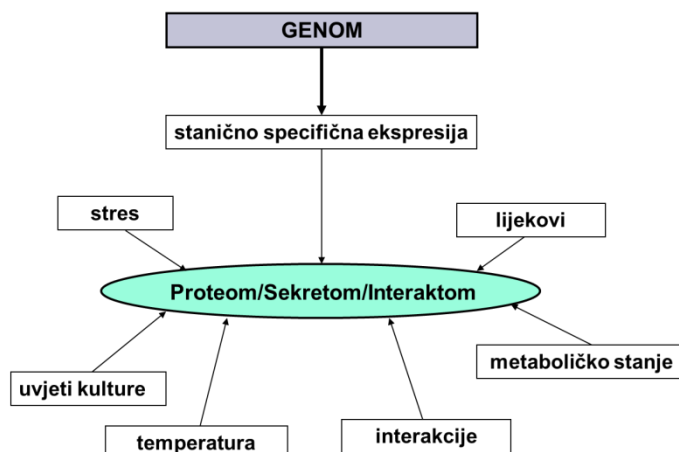
Slika 1. Utjecaj različitih čimbenika abiotičkog stresa na biljni organizam

### Važnost istraživanja proteina

Proteini predstavljaju poveznicu između genoma i višestrukih staničnih aktivnosti. Dok je u genu pohranjena biološka informacija, protein je njegov funkcionalni predstavnik. Da bi se informacija iz gena prevela u protein mora se dogoditi niz važnih procesa u stanici, kao što su transkripcija molekule mRNA, njezina dorada i transport iz jezgre u citoplazmu; translacija proteina te kontrola stabilnosti i kvalitete i njihov transport do krajnjeg odredišta u stanici; te posttranslacijske modifikacije, koji osiguravaju proizvodnju aktivne i funkcionalne proteinske molekule.

Analize strukture i funkcije proteina mogu se izvoditi na razini proteoma, sekretoma i interaktoma. Izraz **proteom** izveden je iz engleskog *PROTEins expressed by a genOME*, a odnosi se na sve proteine jednog organizma, organa ili stanice analogno izrazu genom, koji predstavlja sve gene jednog organizma, organa ili stanice. Proteom predstavlja kvantitativnu ekspresiju proteina u stanici ili organizmu pod precizno definiranim uvjetima i za razliku od genoma vrlo je dinamičan jer različiti čimbenici utječu na ekspresiju proteina u proučavanom sustavu (Slika 2).

Druga razina na kojoj je moguće istraživati proteine je sekretom, koji se također odnosi se na sve proteine jednog organizma, a predstavlja kvantitativnu ekspresiju proteina izlučenih iz stanice ili organizma pod precizno definiranim uvjetima. Kao i proteom, i sekretom je vrlo dinamičan jer različiti čimbenici utječu na ekspresiju sekretornih proteina u proučavanom sustavu (Slika 2).



Slika 2. Utjecaj različitih čimbenika na ekspresiju proteina na razini proteoma, sekretoma i interaktoma

Treća razina je interaktom, koji se odnosi se na fizičke interakcije između molekula proteina s drugim proteinima (*protein-protein interactions*), ali i proteina s drugim vrstama molekula.

Posebna skupina proteina su proteini koje *rade na crno* (*moonlighting proteins*), a uključuju proteine koji mogu izvoditi barem dvije različite funkcije. Obje funkcije nalaze se na istom polipeptidnom lancu, i potpuno su neovisne te često i nepovezane, što znači da inaktivacija jedne funkcije ne utječe na drugu i obratno. U ovu skupinu ne pripadaju proteini koji su nastali kao rezultat fuzije gena te proteini koji su translacijski rezultat različitih varijanti istog gena nakon prekrajanja molekule RNA. Promjena funkcije može biti uvjetovana promjenom tipa stanice; promjenom smještaja u stanici; vezanjem liganda ili interakcijom s većim molekulama (DNA, RNA, protein); i stresnim uvjetima u stanici (temperatura ili promjena u redoks stanju stanice ili neki dr. stres).

## TEHNIKE ZA ISTRAŽIVANJE PROTEINA

### Priprema proteinskih uzoraka

Kako bi se mogla proučavati struktura i/ili funkcija proteina, potrebno ih je izolirati iz stanica, za što je stanice potrebno rastrgati - homogenirati. Homogeniranje se može provesti na više načina npr. u tarioniku s tučkom ili u homogenizatoru s noževima, što ovisi o vrsti i količini materijala iz kojeg se ekstrahiraju proteini. Pri ekstrakciji proteini moraju ostati neoštećeni i zadržati svoju aktivnost. Zbog toga se čitav postupak provodi na temperaturi od +4 °C. Pufer za ekstrakciju također treba biti prethodno ohlađen. Pri izboru pufera treba voditi računa o zadržavanju izotoničnosti u homogenatu (dodatak saharoze, sorbitola ili manitola), sastavu i koncentraciji iona te dodatku antioksidansa kao što su 2-merkaptoetanol, ditiotreitrol (DTT), goveđi serumski albumin (BSA) i askorbinska kiselina, koji štite od oksidacije. Sastav pufera ovisi o proteinima koje se želi analizirati, a vrlo je važna i pH vrijednost pufera. Pri ekstrakciji biljnih proteina dodaje se i polivinilpirolidon (PVP) koji ima ulogu stabilizatora tj. veže na sebe fenole i alkalioide kojima su bogata neka biljna tkiva. Dobiveni homogenat je smjesa krupnijih dijelova stanica, organela te različitih molekula; iz te smjese proteini se razdvajaju centrifugiranjem, koje može biti: a) diferencijalno centrifugiranje pri kojem se iz staničnog homogenata u postupnim koracima centrifugiranja sve većom silom u određenom



vremenu talože različiti stanični dijelovi i b) centrifugiranje u koncentracijskom gradijentu, koje može biti ravnotežno (izopikničko) ili zonalno.

Nakon ekstrakcije proteina iz tkiva potrebno je odrediti koncentraciju proteina kako bi se moglo pristupiti njihovoj daljnjoj analizi. Danas je najčešće u primjeni metoda po Bradford-u, koja se temelji na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 na proteine (Bradford, 1976). Slobodna boja postoji u više različitih ionskih oblika (pKa 1,15; 1,82 i 12,4); anionski oblik (plavi) se veže na proteine i maksimalno apsorbira pri valnoj duljini od 595 nm. Količina proteina se procjenjuje određivanjem količine boje u plavom ionskom obliku. Koncentracija proteina određuje se prema unaprijed pripremljenom baždarnom pravcu nekog proteina npr. BSA. Napravi se serija različitih koncentracija BSA i izmjeri njihova apsorbancija pri 595 nm. Na grafičkom prikazu se na x-os nanosi koncentracija BSA, a na y-os izmjerena apsorbancija pri 595 nm. Kroz dobivene točke se nacrtava baždarni pravac. Nakon toga se izmjeri apsorbancija u proteinskim ekstraktima pri istoj valnoj duljini. Dobivena vrijednost se ucrtava na baždarni pravac i iz njega se očita koncentracija proteina. Nekada se baždarni pravac morao izrađivati prije svakog mjerenja proteinskih ekstrakata. Danas se to ne mora raditi „ručno“ već se baždarni pravac pohrani u memoriju instrumenta, spektrofotometra, i koristi prema potrebi za veći broj mjerenja.

Ako je koncentracija proteina u uzorcima preniska za daljnje analize, uzorke je moguće ukoncentrirati na nekoliko načina. Jedan od načina je taloženje proteina anorganskim neutralnim solima (npr. amonijevim sulfatom), organskim otapalima (npr. acetonom ili trikloroocetenom kiselinom) i polimerima (npr. Sephadex). Svi postupci taloženja provode se pri +4 °C ili nižoj temperaturi kako bi se spriječila denaturacija proteina. Hidrofobni proteini talože se prije nego hidrofilni. Glikoproteini se talože pri većim koncentracijama soli. Proteini se najbolje talože kada je pH vrijednost otopine soli i proteina vrlo slična izoelektričnoj točki, pI, željenog proteina. Ukoncentriravanje proteina može se provoditi i dijalizom nasuprot visokoj koncentraciji polietilen glikola, liofilizacijom i membranskom ultrafiltracijom.

### Elektroforetske tehnike za analizu proteina

Pojmom elektroforeza označavamo gibanje čestica u električnom polju, a njihova pokretljivost ovisi o jakosti električnog polja, svojstvima čestica (neto naboj, veličina i oblik) i sredini u kojoj se čestice gibaju (ionska jakost, viskoznost i temperatura). Elektroforetska pokretljivost definira se kao udaljenost koju čestica prijeđe u vremenu pod djelovanjem gradijenta napona. Većina čestica koje elektroforetski razdvajamo, pa tako i proteini, amfoterne su molekule. Najveći dio naboja proteina potječe od ionizacije karboksilnih i amino skupina, čije se konstante disocijacije (pK vrijednosti) razlikuju, pa neto naboj molekula ovisi o pH vrijednosti sredine u kojoj se nalaze. Stoga će elektroforetska pokretljivost također ovisiti o pH. U koliko je pH vrijednost pufera u kojem izvodimo elektroforezu jednaka pI vrijednosti proteina (to je onaj pH pri kojem je količina + i - naboja na proteinskoj molekuli izjednačena, pa čitava molekula nema neto naboj), on neće migrirati u električnom polju. Pri vrijednostima pH nižima od njegove pI vrijednosti, protein će putovati prema katodi, dok će pri pH višem od njegove pI putovati prema anodi. Većina puferskih sustava prilagođena je izvođenju elektroforeze pri 25 °C, a održavanje stalne temperature važno je jer porast temperature dovodi do difuzije razdvojenih

proteinskih vrpca i zato što povišena temperatura može dovesti do gubitka biološke aktivnosti proteina zbog denaturacije.

Kao analitička metoda, elektroforeza je jednostavna, brza i vrlo osjetljiva. U kombinaciji s drugim tehnikama molekularne biologije, postala je jedna od najčešće primjenjivanih metoda. Postoje različite elektroforetske tehnike za razdvajanje proteina. Elektroforezom se mogu razdvajati proteini kojima je sačuvana nativna struktura (veze između proteinskih podjedinica nisu prekinute) te je samim time sačuvana i aktivnost proteina. Te se tehnike nazivaju nativne (Tablica 1), a prikladne za analize aktivnosti pojedinih enzima ili za razdvajanje složenih proteinskih kompleksa. Neke od tehnika razvijene su za analize denaturiranih proteina (denaturirajuće tehnike), koje razdvajaju proteine kojima su disulfidne veze između podjedinica razorene nekim kemijskim agensom kao što je DTT, 2-merkaptotanol i natrijev dodecil sulfat (SDS), i takvi proteini više nisu aktivni. Nadalje, elektroforetske tehnike se mogu podijeliti na jednodimenzijske (1-DE), koje razdvajaju proteine na temelju jednog fizičko-kemijskog parametra (npr. molekulska masa ili naboj) te dvodimenzijske (2-DE), koje razdvajaju proteine na temelju dva fizičko-kemijska parametra (npr. molekulska masa i naboj) ili čak trodimenzijske tehnike (Tablica 1). Za sve elektroforetske tehnike je zajedničko da su otporne na kontaminacije proteinskih uzoraka drugim tipom molekula tj. ne zahtijevaju pročišćavanje proteina prije razdvajanje u gelu. 1-DE tehnike daju visoku rezoluciju, a 2-DE imaju izuzetno visoku rezoluciju razdvajanja. Uz odgovarajuće metode bojanja može se odrediti količina proteina, a proteini se mogu dalje analizirati (primjenom tehnika spektrometrije masa) i u konačnici identificirati (pretraživanjem proteinskih baza podataka).

Tablica 1. Elektroforetske tehnike za razdvajanje proteina

	Nativne tehnike	Denaturirajuće tehnike
Jednodimenzijske tehnike	Laemmli-PAGE bez SDS-a	Laemmli-SDS-PAGE
	Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)	Tricine-SDS-PAGE
	IEF proteina (nativnih)	IEF proteina (denaturiranih)
	Prijenos proteina (nativnih)	Prijenos proteina (denaturiranih)
Dvodimenzijske tehnike	BN-PAGE/BN-PAGE	IEF/Laemmli-SDS-PAGE
	BN-PAGE/Laemmli-SDS-PAGE	
	BN-PAGE/Tricine-SDS-PAGE	
Trodimenzijska tehnika	BN-PAGE/IEF/Laemmli-SDS-PAGE	

### 1-DE tehnike

Natrijev dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza po Laemmli-u (Laemmli-SDS-PAGE ili kraće SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) najšire je korištena 1-DE tehnika za analizu proteina, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti SDS-a da, u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza, otopi, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance. Većina proteina može vezati 1,4 g SDS/g proteina, maskirajući naboj polipeptidnih lanaca tako da neto naboj po jedinici mase bude približno konstantan. Elektroforetsko razdvajanje ovisi stoga samo o efektivnom promjeru molekule, koji odgovara relativnoj molekulskoj masi, a rezultat je isključivo učinka sita u gelu. Za SDS-PAGE elektroforezu uzorke je važno tretirati na način koji osigurava optimalnu reakciju sa SDS-om, što se postiže zagrijavanjem uzorka u odgovarajućem puferu (koji sadrži SDS i 2-merkaptotanol) barem dvije minute na 100 °C. Pri denaturaciji uzorci se moraju pomiješati s dostatnom

količinom pufera, koja ovisi o koncentraciji proteina u uzorku. Kako proteini pri denaturaciji vežu SDS u približno konstantnom masenom odnosu, nastali kompleksi SDS-proteini imaju ujednačenu gustoću naboja i tijekom elektroforeze migriraju na osnovu molekularnih masa. Stoga se za određivanje približne molekularne mase analiziranih proteina koriste biljezi molekularnih masa (smjesa pročišćenih proteina poznatih molekularnih masa) koji se razdvoje, a potom i vizualiziraju zajedno s analiziranim uzorcima. SDS-PAGE je prikladna metoda za određivanje molekularnih masa proteina koji vežu SDS u stalnom masenom odnosu. Proteini koji su konjugirani s neproteinskim dijelovima (npr. glikoproteini, lipoproteini i sl.) ne mogu biti zasićeni SDS-om, što uzrokuje smanjenje omjera naboj/masa, a to dovodi do smanjene pokretljivosti, pa se čini da protein ima veću molekularnu masu od stvarne. U slučaju glikoproteina ovaj se problem može prevladati upotrebom pufera koji sadrži tris (hidroksimetil) aminometan (Tris), borat i etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA) umjesto uobičajenog pufera za SDS-PAGE koji se sastoji od Tris-a i glicina. Smatra se da nabijeni kompleksi borata i ugljikohidrata dovode do porasta negativnog neto naboja, čime se kompenzira smanjeno vezanje SDS-a, a to uvjetuje takvu gustoću naboja koja omogućava pokretljivost glikoproteina proporcionalnu njihovoj molekularnoj masi.

Tehnika Tricin-SDS-PAGE je 1-DE tehnika posebno razvijena za razdvajanje proteina i peptida malih molekularnih masa (< 30 kDa). Za razliku od klasične SDS-PAGE elektroforeze, koja se temelji na uporabi pufera koji sadrži Tris i glicin, tricin-SDS-PAGE koristi pufer koji umjesto glicina sadrži tricin. Tricin je zwitterionska aminokiselina s puferirajućim područjem od pH 7,4, a naziv molekule potječe od imena *tris* i *glicin* iz kojih je ova aminokiselina nastala. Tricin ima manji negativni naboj od glicina te stoga brže putuje, a velika ionska snaga uzrokuje veće pokretanje iona a manje pokretanje proteina, što omogućava razdvajanje proteina male molekularne mase.

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je metoda visoke moći razlučivanja u kojoj se proteini razdvajaju u prisutnosti kontinuiranog pH gradijenta na osnovu svog naboja. Proteini migriraju zbog svog naboja dok ne dosegnu zonu s vrijednošću pH pri kojoj nemaju neto naboj (tj. svoju izoelektričnu točku, pI) i tada dostižu ravnotežno stanje "nulte" migracije i koncentriraju se tj. fokusiraju u uske zone. Ovom elektroforetskom tehnikom moguće je razdvojiti komponente čije se pI vrijednosti razlikuju za 0,02 pH jedinice, a ako se koriste uski imobilizirani pH gradijenti (imobilini) ta je razlika svega 0,001 pH jedinicu. Najpopularniji način uspostavljanja gradijenta pH za IEF je ugradnja niskomolekularnih amfoternih molekula (amfoliti) u gel. Amfoliti su zwitterioni niske molekularne mase, a predstavljaju mješavinu sintetički dobivenih molekula molekularnih masa od 400 do 1000 Da različitih vrijednosti pI. Gelovi za IEF već sadrže amfolite, a primjenom električnog polja stvara se linearni pH gradijent. Amfoliti migriraju u električnom polju između elektroda dok ne dođu u područje odgovarajuće vrijednosti pI. Na gel za IEF nanose se proteini čija pI je unutar raspona kojeg prekrivaju amfoliti koji se koriste za uspostavu pH gradijenta. Proteini putuju do mjesta na kojem se pH podudara s pI određenog proteina, a uzorak se može nanijeti bilo gdje na gelu jer će molekule s istom vrijednošću pI uvijek putovati na isti položaj.



Tehnika Blue-Native-PAGE (BN-PAGE) inicijalno je razvijena za izolaciju enzimski aktivnih membranskih proteina pri pH 7,5, a glavni sastojak pufera je boja *Coomassie Brilliant Blue G-250* koja se natječe s neutralnim detergentima koji su potrebni za otapanje membranskih proteina. Boja CBB G-250 je negativno nabijena, stoga svi proteini koji vežu CBB G-250 (a to su svi membranski i mnogi topivi) migriraju prema anodi pri pH 7,5 (čak i bazični!). Negativno nabijeni proteini se odbijaju te je na taj način minimaliziran problem agregacije proteina. Nadalje, negativno nabijeni membranski proteini postaju topivi u vodi bez detergenta te se stoga detergenti mogu izostaviti iz gelova, što smanjuje rizik od denaturacije membranskih proteina osjetljivih na detergente. Gelove čak nije potrebno dodatno bojati nakon završetka elektroforeze jer proteini migriraju kao plave vrpce kroz gel. Tehnika BN-PAGE koristi se za izolaciju proteinskih kompleksa iz bioloških membrana i ukupnih staničnih/tkivnih homogenata. Nativni proteini i proteinski kompleksi se razdvajaju na temelju molekulske mase, a tehnika se može koristiti za određivanje molekulske mase proteina i njihovih kompleksa te za diskriminaciju između monomera i dimera. Nativni kompleksi mogu se dalje prenositi s gelova na membrane i analizirati imunodetekcijom. U kombinaciji tehnika SDS-PAGE, BN-PAGE ili IEF/SDS-PAGE mogu se analizirati multiproteinski kompleksi.

## 2-DE tehnike

1-DE tehnike na zadovoljavajući način mogu razdvojiti složene uzorke na stotinjak diskretnih zona. No, broj različitih proteina u nekom uzorku može biti znatno veći - npr. svaki tip ljudskih stanica eksprimira oko 5000 proteinskih gena, te za detaljnu analizu ukupnog proteinskog staničnog ekstrakta moć razlučivanja jednodimenzionalnih tehnika nije ni približno dovoljna. Drugo im je važno ograničenje da se proteini razdvajaju na osnovu samo jednog od svojih fizikalno-kemijskih svojstava (npr. veličina, naboj, hidrofobnost). Stoga diskretne vrpce detektirane nakon elektroforeze ne moraju nužno predstavljati homogene proteine. Takve zone će sadržavati sve proteine u uzorku s istim svojstvima (naboj, pokretljivost, veličina). Stoga je potrebno primijeniti tehnike koje omogućavaju analizu vrlo složenih uzoraka s i po nekoliko tisuća proteina i njihovo međusobno razlučivanje čak i kada imaju slična fizikalno-kemijska svojstva. Najbolji raspoloživi pristup je kombiniranje dvaju različitih jednodimenzionalnih elektroforetskih tehnika u dvodimenzionalni postupak. Metode je najbolje izabrati tako da razdvajaju proteine na osnovu različitih, neovisnih fizikalno-kemijskih svojstava. Tako odabrane metode, ako svaka može razdvojiti 100 diskretnih proteinskih zona, teoretski mogu razdvojiti i do 10000 proteina, no to u praksi nije slučaj, iako je dvodimenzionalna elektroforeza pogodna za analizu proteinske ekspresije u cijelim stanicama, pa čak i tkivima. Važno je napomenuti da osim kombinacije dvaju nativnih ili dvaju



Slika 3. Shematska ilustracija 2-DE

denaturirajućih tehnika u dvodimenzijisku elektroforezu, moguća je i kombinacija jedne native i jedne denaturirajuće tehnike (Tablica 1). Najpopularnija metoda 2-DE je kombinacija izoelektričnog fokusiranja denaturiranih proteina kao prve dimenzije i SDS-PAG elektroforeze kao druge dimenzije (Slika 3). Time se proteini razdvajaju na osnovu dva različita svojstva - naboja i veličine. Prva dimenzija 2-DE razdvaja proteine na osnovu njihovog naboja izoelektričnim fokusiranjem. Ovisno o uzorcima razdvajanje može biti u širokom (pH 3-10) ili uskom (npr. pH 4,5-5,5) gradijentu pH. Danas se uglavnom za izvođenje prve dimenzije rabe komercijalno dostupni gotovi gelovi, imobilini, s već priređenim gradijentom pH koji omogućavaju visoku rezoluciju, izvrsnu ponovljivost te mogućnost razdvajanja veće količine proteina.

Između dviju dimenzija obično je ekvibracijski korak pri kojem se imobilini inkubiraju u ekvibracijskom puferu koji sadrži ureu, glicerol, SDS i DTT ili jodacetoamid (IAA), a svrha ekvibracije je omogućiti proteinima u gelu da u potpunosti reagiraju sa SDS-om kako bi pravilno migrirali u drugoj dimenziji, dok DTT i IAA sprječavaju renaturaciju proteina. Za prelazak proteina iz jednog gela u drugi dobro prijanjanje gelova je ključno. Zato se najčešće prije pokretanja druge dimenzije, IEF gel, naslonjen na površinu SDS gela tako da među njima nema mjehurića zraka, zalije agarozom. Od velike je važnosti za reproducibilnost rezultata svaki korak u 2-DE izvesti pažljivo i pod kontroliranim i što je moguće konstantnijim uvjetima.

#### Metode za vizualizaciju proteina u gelu

Nakon razdvajanja proteina u gelu potrebno je primijeniti neku od metoda za vizualizaciju proteina. Najpopularnija i najčešća tehnika zasniva se na uporabi nepolarnih sulfatiranih Coomassie boja, razvijenih za bojanje vune. Uglavnom se koristi *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R-250, boja koja se u kiseloj sredini elektrostatskim silama veže za amino skupine proteina. Rabi se otopina 0,1% (w/v) CBB u metanolu, destiliranoj vodi i octenoj kiselini (9:9:2, v/v/v). Vrijeme potrebno za bojanje ovisi o debljini gela, a u prosjeku je oko 2 sata, nakon čega su i proteini i gel plavi. Kako bi se vizualizirale proteinske pruge potrebno je odbojiti gel uz lagano miješanje u istoj otopini metanola i octene kiseline bez dodatka boje 24 sata, što se može ubrzati mijenjanjem otopine za odbojavanje. Nakon odbojavanja proteini se vide kao tamnoplave pruge na bezbojnoj pozadini. Glavni nedostatak metode je relativno slaba osjetljivost tj. treba nanijeti relativno veliku količinu proteina (oko 20 µg proteina po jažici) kako bi se vizualizirali proteini. Prednost metode je da je kompatibilna sa tehnikama spektrometrije masa te da je količina proteina koja se nanosi za vizualizaciju dostatna za identifikaciju proteina spektrometrijom masa.

Tehnika zasnovana na **bojanju srebrovim** nitratom ( $\text{AgNO}_3$ ) znatno je osjetljivija od CBB i može detektirati 0,1 ng proteina po vrpici, što ju čini izuzetno važnom pri analizi uzoraka raspoloživih u ograničenim količinama. Gelovi se nakon elektroforeze fiksiraju u mješavini etanola, octene kiseline i  $\text{deH}_2\text{O}$ . Prije bojanja gelove je potrebno dobro isprati u otopini etanola kako bi se uklonili ostaci Tris-a, SDS-a i glicina iz gela, jer mogu vezati srebro i time pojačati pozadinsko bojenje. Većina protokola prije impregnacije srebrom uključuje predtretman u kojem se povećava osjetljivost i kontrast. Sve metode bojenja srebrom uključuju redukciju ionskog u metalno srebro, no točan mehanizam reakcije nije poznat. Smatra se da se ioni srebra vežu na amino skupine proteina, naročito lizina. Nedostaci ove

metode su izrazito pozadinsko bojenje (čistoća reagensa i vode od iznimne je važnosti), slaba reproducibilnost, a neki se proteini boje vrlo slabo, gotovo nikako. Nadalje, metoda načelno nije kompatibilna sa spektrometrijom masa.

Najveća osjetljivost detekcije proteina može se postići upotrebom fluorescentnih boja. Danas na tržištu postoji veliki izbor ovih boja različitih proizvođača, a boja se razvija izlaganjem izvoru standardnog UV-transiluminatora ili transiluminatora s plavim svjetlom. Osjetljivost ovih boja veća je nego osjetljivost CBB i usporediva s osjetljivošću  $\text{AgNO}_3$ , pa čak i bolja. Njihova primjena vrlo je jednostavna: proteini se fiksiraju, boje 3 h do preko noći i ispiru u  $\text{deH}_2\text{O}$  30 min. Nadalje, moguće je određivanje količine proteina iz gela, što CBB može, ali  $\text{AgNO}_3$  ne može. Fluorescentne boje vrlo su kompatibilne s tehnikama spektrometrije masa. Nedostaci su visoka cijena boje i transiluminatora, a ako se neki od proteina želi dalje analizirati spektrometrijom masa, potreban je uređaj za izrezivanje proteina iz gela (tzv. *spot picker*).

Nakon vizualizacije proteina na 1-D i 2-D gelovima, pristupa se analizi dobivenih proteinskih profila s ciljem pronalaženja kvantitativnih i/ili kvalitativnih razlika u ekspresiji proteina. 1-D gelovi se često analiziraju bez primjene posebnih računalnih programa jer je proteinska slika relativno jednostavna i sastoji se od ne prevelikog broja proteinskih vrpca u svakom uzorku, iako su za analize 1-D gelova razvijeni računalni programi (npr. *ImageQuant TL*). S druge strane, proteinska slika nakon razdvajanja proteina tehnikom 2-DE je izuzetno složena te se analiza 2-D gelova izvodi gotovo isključivo primjenom nekog od računalnih programa (*Melanie 4*, *ImageMaster 2D platinum*, *PDQuest 6.1*), koji su komercijalno dostupni.

### Prijenos proteina i imunodetekcija

Bez obzira na široku primjenu elektroforetskih tehnika u analizi proteinskih uzoraka, one ipak ne pružaju izravne informacije o identitetu i funkcionalnim osobinama razdvojenih proteina. To je potaknulo razvoj tehnike *Western blotting* u kojima se razdvojeni proteini prenose iz gela na površinu nekog tankog nosača, kao što je npr. nitrocelulozna membrana. Proteini su tada fiksirani na površini membrane i lako dostupni za analize npr. protutijelima ili drugim ligandima. Brz i učinkovit prijenos razdvojenih proteina s poliakrilamidnih gelova na površinu membrane postiže se primjenom električnog polja okomitog na ravninu gela. Takav se prijenos naziva „elektroprijenos“. Prednosti elektroprijenosa su visoka rezolucija razdvajanja složenih smjesa proteina na 1-D i 2-D gelovima, tehnika je jednostavna, brza i čista te omogućuje rad s malim količinama proteina i daje jasan rezultat.

Dva su osnovna tipa prijenosa proteina iz gela na membranu, a koji izabrati ovisi prvenstveno o vrsti i veličini proteina koje analiziramo. Prvi tip je mokri prijenos (engl. *wet blotting*) koji se izvodi u uspravnoj kadici ispunjenoj puferom. Mokri tip prijenosa prikladan je za hidrofobne ili velike proteini (>100 kDa), može trajati između 1 i 16h i obično se izvodi pri konstantnom naponu. Drugi tip prijenosa je polusuhi prijenos (engl. *semi-dry blotting*) koji se izvodi u horizontalnim uređajima koji trebaju male količine pufera. Polusuhi prijenos prikladan je za hidrofilne proteine ili proteine malih masa (<100 kDa) i traje do 2h pri konstantnoj jačini struje. Za prijenos proteina u oba tipa prijenosa

može se koristiti različiti tipovi membrana. Najčešće se rabi nitrocelulozna membrana, koja je kompatibilna s većinom metoda za vizualizaciju proteina, relativno je jeftina i ima visok kapacitet vezanja proteina. U širokoj upotrebi su i hidrofobne poliviniliden difluoridne (PVDF) membrane, koje imaju veliku mehaničku čvrstoću, visok kapacitet vezanja proteina i kompatibilne su s većinom protokola za *Western blotting*. Prednost im je što se na njih vezani proteini mogu koristiti za kemijsku karakterizaciju tj. određivanje primarne strukture i kompatibilne su s tehnikama spektrometrije masa.

Ključni korak nakon prijenosa proteina na membranu je blokiranje membrane kako bi se blokirala mjesta na membrani gdje nema proteina i na taj način reduciralo nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Ako je blokiranje preslabo pojaviti će se jako pozadinsko bojenje, a u slučaju da je blokiranje prejako doći će do smanjenja signala. Za blokiranje membrana koriste se različiti agensi kao npr. bezmasno mlijeko u prahu, detergent Tween 20<sup>®</sup> i BSA. Nakon blokiranja membrane, željeni protein se može otkriti primjenom odgovarajućeg protutijela. Membrana se prvo inkubira u otopini primarnog protutijela, a na primarno protutijelo se zatim veže sekundarno koje specifično prepoznaje molekule IgG iz vrste u kojoj je proizvedeno primarno protutijelo. Sekundarna protutijela dolaze u kompleksu s enzimom koji omogućuje vidljivost signala i određuje način detekcije. Najčešće korišteni enzimi su alkalna fosfataza i peroksidaza iz hrena, a koriste se za kolorimetrijsku ili kemiluminiscencijsku reakciju. Dodavanjem kromogenog supstrata alkalnoj fosfatazi ili peroksidazi iz hrena dolazi do enzimske reakcije čiji je produkt obojan i taloži se na mjestu vezanja protutijela. Dodavanjem kemiluminiscencijskog supstrata alkalnoj fosfatazi ili peroksidazi iz hrena dolazi do emisije svjetla na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela, a ta mjesta se vide kao zatamnjene pruge. Za više informacija o elektroforetskim tehnikama istraživanja proteina pogledati sveučilišni priručnik autora Balen i sur. (2011).

### Spektrometrija masa i identifikacija proteina

Spektrometrijom masa (engl. *mass spectrometry*, MS) može se analizirati intaktni protein ili smjesa peptida nastalih digestijom proteina prije analize. Najrašireniji način analize proteina uključuje enzimsko cijepanje proteina u gelu (nakon 1-DE ili 2-DE) ili u otopini prikladnom proteinazom, najčešće tripsinom, koji cijepa proteine iza aminokiseline Lys i Arg. Nakon cijepanja proteina, nastali proteinski ili peptidni fragmenti se analiziraju nekom od tehnika spektrometrije masa. Najbrža metoda za identifikaciju proteina je tzv. metoda otiska prsta (engl. *peptide mass fingerprint*, PMF). Osnovni princip metode temelji se na uspoređivanju eksperimentalno određenih masa peptida s teorijski izračunatim masama pohranjenim u bazama podataka (*NCBI*, *SwissProt*).

Za analize proteina razvijene su dvije moćne platforme spektrometrije masa. Prva od njih je matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization*, MALDI). Tehnikom MALDI uglavnom nastaju jednostruko nabijeni ioni. Budući da se radi o pulsnoj tehnici, najčešće se povezuje s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *time of flight*, TOF), ali je moguće i povezivanje s analizatorima koji skladište ione, primjerice ionska stupica (engl. *ion trap*). Tehnika MALDI-TOF odlikuje se iznimnom osjetljivošću, velikom brzinom analiza (moguće je analizirati oko 100 uzoraka u

10 min) i neosjetljivošću na kontaminaciju uzorka s drugim molekulama, a nedostatak je da je načelno prikladna samo za analizu proteina organizama čiji je genom sekvenciran.

Druga platforma je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *ElectroSpray Ionization, ESI*), koja omogućava sekvenciranje proteina *de novo* te daje podatke o aminokiselinskom sastavu izabranog triptičkog peptida. Naime, identifikacija proteina metodom PMF temelji se na uspoređivanju eksperimentalno dobivenih podataka s teorijski izračunatim masama u bazama podataka. Genomski slijed velikog broja organizama je i dalje nepoznat, pa prema tome u bazama nisu zastupljeni podaci o odgovarajućim proteinima. Osim toga, ako i u bazama postoje podaci o poznatim proteinima različite modifikacije kao npr. posttranslacijske modifikacije, mogu onemogućiti identifikaciju dijela ili cijelog proteinskog aminokiselinskog slijeda. Zbog toga potpuno određivanje primarne strukture proteina zahtijeva određivanje aminokiselinskog slijeda s minimalnom uporabom baza podataka, odnosno *de novo* sekvenciranje peptida i proteina. Za više informacija o tehnikama spektrometrije masa pogledati pregledni rad autora Galić i Cindrić (2008).

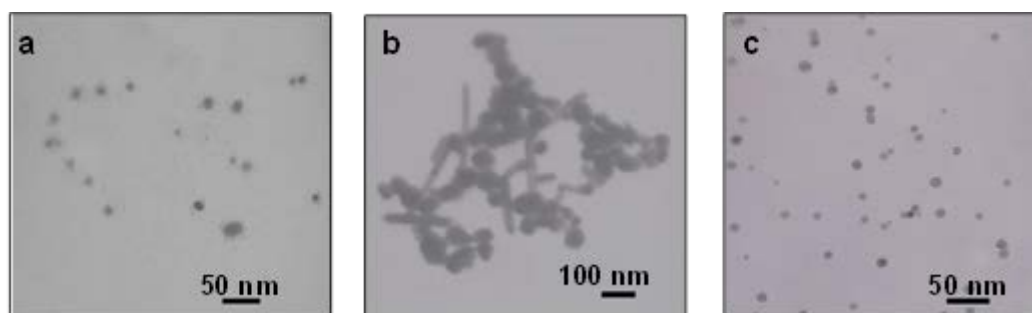
Za identifikaciju proteina na temelju masa peptida razvijeni su različiti algoritmi. Neki od tih algoritama rade pretraživanje nakon pretvorbe spektralnih podataka u tekstualni numerički oblik, a nekima je dostatan spektar masa u originalnom digitalnom zapisu za provedbu pretraživanja baze ili više baza podataka. Prvi su vremenski zahtjevniji i većinom su dostupni putem interneta (npr. *ProteinProspector*) te nisu namijenjeni visokofrekventnim analizama (engl. *high-throughput analysis*), dok su drugi komercijalni i vezani uz pojedine proizvođače spektrometara masa (npr. *Mascot* ili *GlobalLynx*). Budući da cijepanjem proteina specifičnom proteinazom (npr. tripsinom) nastaje jedinstveni skup peptida, dovoljno je samo nekoliko točno određenih masa peptida za identifikaciju proteina (naravno uz uvjet da je protein prisutan u bazi podataka ili da nije dodatno modificiran).

## IZLAGANJE BILJAKA STRESU NANOČESTICAMA SREBRA U EKSPERIMENTALNIM UVJETIMA

U našim istraživanjima pokušavamo otkriti i objasniti toksične učinke nekoliko različitih tipova nanočestica srebra na biljke. Kao modelne organizme koristimo luk (*Allium cepa*) i duhan (*Nicotiana tabacum* L.). *A. cepa* je 1938. godine je prvi puta korišten kao modelni organizam u citogenetičkim testovima ispitivanja učinka kolhicina. Ova se biljna vrsta od tada koristi kao bioindikator različitih vrsta onečišćenja i kontaminacija te kao modelni organizam za istraživanja u molekularnoj i staničnoj biologiji zbog brojnih prednosti kao što su lak uzgoj i održavanje, visoka osjetljivost na promijenjene uvjete, kratko vrijeme klijanja, stalne mitotske diobe i jednostavnost manipulacije. Toksikološka ispitivanja na *A. cepa* koriste se za utvrđivanje bioakumulacije kemijskih supstanci u tkivima luka, inhibicije rasta korijena i listova, citogenetičkih ili mutagenih učinaka te odgovora na oksidacijski stres. Genom ove biljne vrste do danas na žalost nije sekvenciran te stoga *A. cepa* nije idealan model za istraživanje proteina. U našem istraživanju glavice luka s korjenčićima uronimo u otopine AgNP i u otopine AgNO<sub>3</sub> istih koncentracija. Kao kontrole koristimo korjenčiće lukovica uronjene u vodu. Tretman izlaganja korjenčića navedenim otopinama traje 72 h.



Duhan je ekonomski važna vrsta koja se često koristi kao model u istraživanjima abiotičkog stresa jer je relativno tolerantan na stresne uvjete i ima široku rasprostranjenost. Nadalje, biljka je relativno dostupna, ima kratko generacijsko vrijeme i može se lagano transformirati. Tijekom rada sa kulturom tkiva duhana, Murashige i Skoog (1962) razvili su sastav hranjivih podloga kao medija za proučavanje kulture biljaka u uvjetima *in vitro*, što je kasnije omogućilo primjenu na stotine drugih biljnih organizama. Budući da je genom duhana sekvenciran (Sierra i sur., 2014), ova biljna vrsta prikladna je za istraživanja proteina. U našim istraživanjima biljke duhana uzgajamo u uvjetima kulture tkiva u tekućim i krutim hranjivim podlogama po Murashige i Skoog-u (podloge MS), u koje dodajemo otopine AgNP i AgNO<sub>3</sub> u odgovarajućim koncentracijama. Kontrolne biljke rastu na podlozi MS bez dodatka AgNP ili AgNO<sub>3</sub>. Istraživanja provodimo u različitim razvojnim stadijima duhana - sjemenkama, klijancima i odraslim biljkama.



Slika 4. Nanočestice srebra (AgNP) pripravljene iz AgNO<sub>3</sub> i stabilizirane s različitim omotačima: a - polivinilpirolidonom (AgNP-PVP, neutralne), b - citratom (AgNP-citrat, negativno nabijene) i c - cetil-trimetil-amonijevim bromidom (AgNP-CTAB, pozitivno nabijene). AgNP su snimljene transmisivnim elektronskim mikroskopom pri povećanju od 85000x (snimila P. Peharec Štefanić)

U našim istraživanjima pratimo utjecaj tri laboratorijski sintetizirana tipa nanočestica srebra s različitim omotačima, polivinilpirolidonom (AgNP-PVP, neutralne), citratom (AgNP-citrat, negativno nabijene) i cetil-trimetil-amonijevim bromidom (AgNP-CTAB, pozitivno nabijene) (Slika 4), kako bismo ustanovili utječu li različite osobine ovih nanočestica na njihovu toksičnost. Također ispituje i utjecaj komercijalno dostupnih nanočestica srebra s citratnim omotačem, ali i omotačima od polietilen glikola (AgNP-PEG, neutralne) i razgranatog polietilenimina (engl. *branched polyethyleneimine* -AgNP-bPEI, pozitivno nabijene). Osim toga, da bismo ustanovili potječe li toksičnost AgNPs od iona srebra oslobođenih sa čestica ili od samih nanočestica, određujemo stabilnost i moguću biotransformaciju AgNPs te utvrđujemo ulaze li nanočestice u tom obliku u biljno tkivo, odnosno stanicu. Pratimo dolazi li tijekom izlaganja nanosrebru do promjene u sastavu proteina.

Za analize promjena u proteomu luka i duhana koristimo tehnike i metode prikazane na Slici 5. U proteinskim ekstraktima korjenčića luka te klijanaca, listova i korijena biljke duhana, pripremljenima u kalij-fosfatnom puferu, određujemo ekspresiju važnih antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze (SOD), pirogalol peroksidaze (PPX), askorbat peroksidaze (APX), katalaze (CAT) i glutation reduktaze (GR) mjerenjem njihove aktivnosti spektrofotometrijski, analizom izoformi u gelu nativnom elektroforezom te uporabom specifičnih protutijela, nakon razdvajanja proteina SDS-PAG elektroforezom i njihovog prijenosa na membrane metodom *Western blotting* (Balen i sur., 2012; Biba, 2016).

Za izolaciju proteina za 2-DE, koristimo metodu ekstrakcije proteina fenolom (Pavoković i sur., 2012). 2-DE izvodimo prema standardnom protokolu u kojem u prvoj dimenziji (IEF) proteine razdvajamo prema naboju, a u drugoj dimenziji (SDS-PAGE) prema molekularnoj masi. (Balen i sur., 2011). Nakon bojanja gelova bojom Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) i vizualizacije proteina, gelove skeniramo te kvantitativno i kvalitativno analiziramo korištenjem računalnog softvera ImageMaster 2D Platinum. Proteine koji pokazuju promijenu u ekspresiji, izrezujemo iz gelova, cijepamo proteazom tripsin i analiziramo spektrometrijom masa MALDI-TOF. Identifikacija proteina izvodi se pretraživanjem baza podataka SwissProt i NCBI. Analize provodimo na razini proteoma, sekretoma i interaktoma.

## ZAKLJUČAK

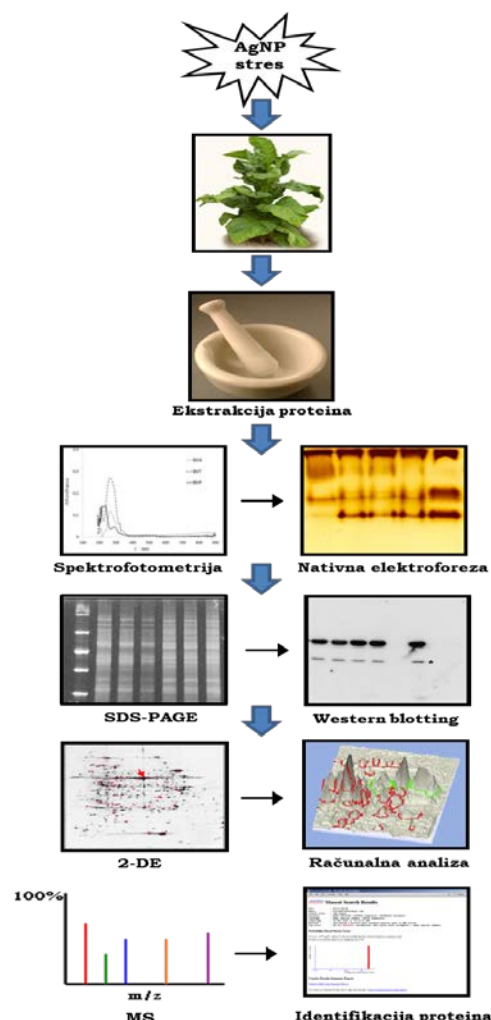
Ovim istraživanjima stvorit ćemo bazu podataka biljnih proteina čija se ekspresija kvalitativno ili kvantitativno mijenja nakon izlaganja biljaka česticama nanosrebra, a koja se može direktno povezati s učinkom čestica AgNP te upotrijebiti za predviđanje potencijalnih učinaka AgNP u prirodnom okolišu. Nadalje, novi biomarkeri toksičnosti nanočestica otkriveni u luku i duhanu mogli bi se koristiti za detekciju mogućih onečišćivača koji sadrže AgNP u kopnenom okolišu.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo Hrvatskoj zakladi za znanost (HRZZ) i Europskom socijalnom fondu (ESF) koji financiraju ova istraživanja u okviru projekata NanoPhytoTox (HRZZ, IP-2014-09-6488) i NanoPSI (ESF).

## LITERATURA

- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., Paknikar, K. M. (2009), Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 310-318.
- Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M. (2011), Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, Zagreb, Hrvatska sveučilišna naklada
- Balen, B., Tkalec, M., Peharec Štefanić, P., Vidaković-Cifrek, Ž., Krsnik-Rasol, M. (2012), In vitro conditions affect photosynthetic performance and crassulacean acid metabolism in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. tissues. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1883-1893.
- Biba, R., (2016), Utjecaj nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa i ekspresiju proteina u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Galić, N., Cindrić, M. (2008), Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 57(5), 231-243.



Slika 5. Shematski prikaz tehnika i metoda koje se primjenjuju u istraživanju utjecaja nanočestica srebra na ekspresiju proteina u biljnim organizmima

- Gopinath, P., Gogoi, S. K., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A., Ghosh, S. S. (2010), Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids and Surfaces B*, 77, 240-245.
- Hsin, Y. H., Chen, C. F., Huang, S., Shih, T. S., Lai, P. S., Chueh, P. J. (2008), The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters* 179(3), 130-139.
- Ivanković, M. (2011), Nanomaterijali i nanoproizvodi - mogućnosti i rizici. *Polimeri*, 32, 23-28.
- Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S. (2009) In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science and Technology*, 43, 6046-6051.
- Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lanje, A. S., Sharma, S. J., Pode, R. B. (2010), Synthesis of silver nanoparticles: a safer alternative to conventional antimicrobial and antibacterial agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2, 478-483.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-479.
- Nowack, B., Bucheli, T. D. (2007), Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 50, 5-22.
- Pavoković, D., Križnik, B., Krsnik-Rasol, M. (2012), Evaluation of protein extraction methods for proteomic analysis of non-model recalcitrant plant tissues. *Croatica Chemica Acta*, 85, 177-183.
- Sierro, N., Battey, J. N., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., Ivanov, N. V. (2014), The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications*, 5, 3833.
- Suresh, K., Sivakumar, K., Vijayaanand, M. A., Rajalingam, K., Rajkamal, G. (2010), Anti-lipidperoxidative and antioxidant effects of Zingiber officinale roscoe root extract in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced oral carcinogenesis. *Pharmacologyonline*, 2, 689-701.
- Tolaymat, T. M., El Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., Suidan, M. (2010), An 882 evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and 883 applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of Total Environment*, 408, 999-1006.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., Hull, M. S. (2015), Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 1769-1780.

## CHANGES IN EXPRESSION OF PLANT PROTEINS INDUCED BY SILVER NANOPARTICLES

*Balen Biljana*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb ([bbalen@biol.pmf.hr](mailto:bbalen@biol.pmf.hr))

### ABSTRACT

Nanotechnology is the latest in a long series of technologies which announces new era of technologies-driven prosperity. The small size of nanoparticles (NPs), with at least one dimension between 1 and 100 nm, results in unique chemical and physical characteristics, which is why they are being produced in large quantities for implementation in various consumer products. Among different available NPs, silver nanoparticles (AgNPs) are the dominating nanomaterial because of well-known silver antibacterial and antifungal properties. Due to widespread use and exposure to these nanomaterials, there is ever-growing concern regarding their potential detrimental impacts on the environment. Although there have been quite a number of toxicological studies published on AgNPs, it is still difficult to draw definite conclusions about their toxicity. As soon as AgNPs are released into the environment, they start to transform, which modifies their properties influencing their transport, fate and possible toxicity. As primary producers plants are the vital part of healthy ecosystems but also play a significant role in transport and bioaccumulation of possibly toxic substances into food chains. Toxicological studies of AgNPs conducted on plants are scarce and inconclusive. Moreover, there is a lack of information about AgNPs-induced effects on important cellular processes. Therefore, in this research we aim to reveal and explain the toxicity of a set of diverse AgNPs to plants, onion and tobacco, in order to contribute to the environmental hazard assessment of AgNPs as well as to the basic knowledge about the mechanisms of their toxicity. We want to establish the possible proteomic changes upon exposure to treatments with AgNPs. The results will be used to define biomarkers of AgNP-induced phytotoxicity, which could be useful for environmental biomonitoring. Obtained results can also be applied to estimate the possibility of use and safety of AgNPs implemented in agricultural products, such as fertilizers and pesticides.

**Keywords:** abiotic stress, nanosilver, proteins, electrophoresis, mass spectrometry